

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

08/7373/9
PC/JP96/00574
08.03.96 7

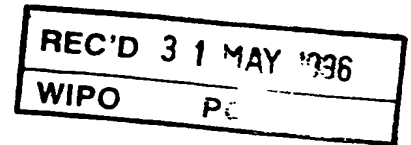
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1995年 3月10日

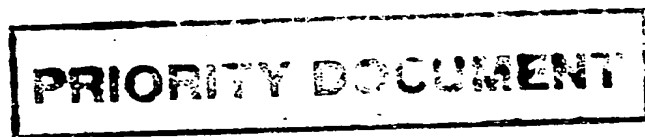


出願番号
Application Number:

平成 7年特許願第051234号

出願人
Applicant(s):

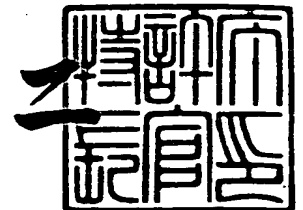
麒麟麦酒株式会社



1996年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

清川 佑二



出証番号 出証特平08-3026621

【書類名】 特許願

【整理番号】 P95-0066

【提出日】 平成 7年 3月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/61

【発明の名称】 カロチノイド生産量の増量に有用なDNA鎖

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5
麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 梶原 将

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5
麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 三沢 典彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-5
麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内

【氏名】 近藤 恵二

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代表者】 真鍋 圭作

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406585

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 カロチノイド生産量の増量に有用なDNA鎖

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号1に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

【請求項2】 カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号2に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

【請求項3】 請求項1～2のいずれか1項に記載のDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【請求項4】 アミノ酸配列が実質的に配列番号3に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、カロチノイドの生合成において、カロチノイド含量を増量させるDNA鎖、および、このDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、カロチノイド含量を増量させることを特徴とするカロチノイドの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

カロチノイド(carotenoid)とは、通常、炭素鎖が40のイソプレン骨格からなる自然界に豊富に存在する天然色素の総称である。現在までに、約600種類のカロチノイドが単離、同定されている [Key to Carotenoids. Basel・Boston, Bir

khauser, 1987. (Pfander, H. ed.) 参照]。カロチノイドは、ステロイドやテルペノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される。イソプレン基本生合成経路により、ヒドロキシメチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) は、メバロン酸を経て、C5のイソペンテニルピロリン酸 (IPP) に変換され、IPP は異性化反応によりジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) に変換される。さらに、DMAPPは、C5のIPPと順次、縮重合することにより、C10のゲラニルピロリン酸 (GPP)、C15のファルネシルピロリン酸 (FPP)、C20のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) というふうに、炭素数を5つつつ延ばしていくのである (図1)。

【0003】

カロチノイド生合成経路は、GGPPにおいてイソプレン基本生合成経路から分岐する。すなわち、2分子のGGPPが縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエン (phytoene) が合成される。フィトエンは不飽和反応によりリコペン (lycopene) に変換され、さらに、リコペンは環化反応により β -カロチン (β -carotene) に変換される。そして、 β -カロチンに水酸基やケト基などが導入され、ゼアキサンチン (zeaxanthin) やアスタキサンチン (astaxanthin) などの種々のキサントフィルが合成される。

【0004】

最近、発明者らは、植物常在非光合成細菌 Erwinia uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群を、その黄色の色調を指標に大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子の機能を明らかにした後、これらの遺伝子のいろいろな組み合わせを導入、発現させることにより、大腸菌、酵母などの微生物に、フィトエン、リコペン、 β -カロチン、ゼアキサンチンなどを生産させることを可能にした (図2 参照) : [Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., "Elucidation of the Erwinia uredovora carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in Escherichia coli". J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990、及び、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847

-1849, 1991、及び、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, p.1112-1114, 1994、及び、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」参照]。すなわち、Er. uredovora のカロチノイド生合成遺伝子群により FPPからカロチノイドを合成することができるが、FPPは、カロチノイドだけでなく、ステロイドやテルペノイドの共通の基質であるので、カロチノイドを合成できない微生物でも、FPPは有している。したがって、たとえば、FPPから β -カロチンの生合成に必要な4つの crt 遺伝子、crtE, crtB, crtI, crtY を導入すると、その導入された微生物は β -カロチンを産生するようになる（図2参照）。さらに、発明者らは、同様の手法により、海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum のカロチノイド生合成遺伝子群を大腸菌にクローニングし、これらの遺伝子と上記の Er. uredovora のカロチノイド遺伝子のいろいろな組み合わせを発現させることにより、大腸菌などの微生物に、さらに、アスタキサンチン、カンタキサンチンなどを生産させることも可能にした（図3参照）：（三沢典彦ら、「遺伝子レベルでのアスタキサンチン生合成経路の解明」第36回天然有機化合物討論会講演要旨集p.175-180, 1994）。前述したカロチノイドの中でも、特に、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -カロチンは、赤色や黄色の天然着色料として、癌予防や免疫賦活活性やプロビタミンA活性を有する栄養価改善剤として、食用や飼料用にすでに実用化され、有望視されているものである。したがって、発明者らが取得したカロチノイド生合成遺伝子を用いることによって、これらを外来遺伝子として遺伝子工学的手法により大腸菌などの微生物を形質転換し発現させることによって、大腸菌などの微生物に、これらの有用カロチノイドの生合成能を付与することが可能となった。これまでは、有用カロチノイドの微生物生産を行うためには、そのカロチノイドを十分量合成できる微生物を探し、培養条件の検討や突然変異処理などによって、その生産量を上げることを試みるくらいしか検討できることはなかった。発明者らの研究により、生産菌となる微生物のカロチノイド合成能の有無にかかわらず、増殖が容易でしかも速く、たとえ食用として用いても安全性が

保証されているような微生物を、カロチノイド生産のための宿主として選ぶことができるようになった。もちろん、最初から有用カロチノイドを十分量合成できるような微生物を宿主として用い、Er.uredovora や Ag.aurantiacum のカロチノイド生合成遺伝子の導入により、その生産量をさらに上げたり、最終カロチノイド産物を変換したりすることも可能である。たとえば、最終産物として β -カロチンを合成できる微生物に、Ag.aurantiacumの crtW と crtZ 遺伝子を導入し、発現させることにより、アスタキサンチンを最終産物として生産する微生物に変換することが可能となった。

【0005】

一方、アスタキサンチンや β -カロチンは、有機合成法によっても合成される。有機合成法においては、これらのカロチノイドが飼料や食品添加剤として用いられることを考慮すると、反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残し、また、消費者の天然物嗜好にも反している。しかしながら、価格的には、従来の発酵法によるカロチノイド生産は有機合成法に勝てないのが現状であった。すでに述べてきたように、上記のカロチノイド生合成遺伝子の利用により、発酵法によるカロチノイドの生産法を改善することが可能であり、そのことにより、価格的に有機合成法に対抗することが可能になると考えられるが、その成否は、微生物に蓄積するカロチノイドの含量をどこまで上げられるかということにかかっているのである。それゆえ、微生物によるカロチノイドの生産において、カロチノイド含量を増量させるような技術が望まれていた。

【0006】

従来、微生物によるカロチノイドの生合成において、カロチノイドの合成量を増量させるための手段としては、NTGなどの突然変異剤によるランダムミューテーションにより、カロチノイド含量が増量した変異株を選抜するという伝統的方法しかなかった。しかし、この方法は技術者の多大の時間と労力を必要とし、しかも、カロチノイドの合成量の増量に成功したとしても、理論的裏付けが無いので、その後、頻繁に起こる回帰自然突然変異によるカロチノイド含量の減少を食い止めるのにも多大の時間と労力を必要としたのである。

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、微生物によるカロチノイドの生合成において、その生産量を増量させることにある。

【0008】

【課題を達成するための手段】

発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究を重ねた結果、たった1種類の遺伝子を含むDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、その微生物のカロチノイド生産量を数倍上げることができる技術を開発した。

すなわち、本発明者らは、タンパク質のアミノ酸配列が、実質的に、IPPからDMAPPの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子を含むDNA鎖を、Er.uredovoraなどのカロチノイド合成遺伝子を有する大腸菌などの微生物に導入すると、リコペン、 β -カロチンなどのカロチノイド含量がコントロールの1.5~4.5倍に増量することを見い出し、本発明を完成するに至った。なお、タンパク質のアミノ酸配列が、実質的に、IPPからDMAPPの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子は、アスタキサンチン産生微生物であるP. haffia rhodozymaやHaematococcus pluvialisなどから得られた。

【0009】

本発明によるDNA鎖は下記に示すものである。

(1) カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号1に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

(2) カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、アミノ酸配列が実質的に配列番号2に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖。

【0010】

本発明はまた、カロチノイドの製造法にも関する。

すなわち、本発明によるカロチノイドの製造法は下記に示すものである。

(3) 上記(1)~(2)のいずれかに記載のDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させ

ることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

(4) アミノ酸配列が実質的に配列番号3に示した配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

「従来の技術」の項で詳しく述べたように、非光合成土壌細菌 Erwinia uredovora および海洋細菌 Agrobacterium aurantiacum などのカロチノイド生合成遺伝子を導入することにより、大腸菌などの微生物は、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、 β -カロチン、リコペンなどの有用カロチノイドを生産するようになる。一方、価格的に、有機合成法に競合するためには、カロチノイドの生産量をできるだけ上げる必要がある。本発明によるIPPイソメラーゼ遺伝子（アミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるポリペプチドをコードする遺伝子を含む）は、このカロチノイドの生産量の増量に極めて有用である。現在の進んだ遺伝子工学的手法により、外来遺伝子の発現レベルを上げることにより、その外来遺伝子がコードするタンパク質の生産量を上げることは比較的容易である。しかしながら、いくらタンパク質の生産量を上げたところで、そのタンパク質（酵素）が必要とする基質量が限られていれば、カロチノイドなどのバイオケミカルズの高生産には結びつかない。たとえば、カロチノイド合成遺伝子群の発現レベルを向上させたところで、それらの最初の基質であるFPPが細胞内に十分に無ければ、カロチノイドの高生産に結びつかない。今回、IPPイソメラーゼ遺伝子を導入することによりカロチノイド生産量の増量に成功したのは、そのことによりFPPまでの上流の経路（図1参照）が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、カロチノイドの増量に結びついたと考察することができる。しかしながら、本発明は、IPPからDMAPP、または、DMAPPからIPPへの変換を触媒する酵素であるIPPイソメラーゼ、または、IPPイソメラーゼと相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を、カロチノイドを生産する大腸菌などの微生物に導入し、発現させると、これらカロチノイドの生産量が増量されることを見いだしたことに端を

発している。すなわち、Er. uredovoraのカロチノイド生合成群の利用により β -カロチンを産生する大腸菌を宿主として、Phaffia rhodozyma、Haematococcus pluvialisなどのcDNA発現ライブラリーを作製し、 β -カロチン含量が増加することにより、黄色の色調が明るくなり橙色に近づいたコロニーが出現したので、その大腸菌が有するプラスミドを分析した結果、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼと高い相同性を有する遺伝子が存在することを見いだしたのである。従来から、HMG-CoAからメバロン酸への反応を触媒するHMG-CoAレダクターゼ（図1）がカロチノイドを含むテルペノイドの律速段階酵素かもしれないという推察は存在していたが、IPPイソメラーゼについてはそのような報告は無く、IPPイソメラーゼをコードする遺伝子を導入することにより、カロチノイドの生産量が増量されるというのは新知見であった。

【0012】

すなわち、本発明は、カロチノイドの生産量を増量させる特性を有してアミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、及び、このDNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法を提供するものである。

本発明によるDNA鎖は、前記(1)(2)に記載されるDNA鎖、またはそれらとストリレンジントな条件下でハイブリダイズするDNA鎖である。

【0013】

本発明によるDNA鎖がコードするポリペプチドは、アミノ酸配列が実質的に配列番号1（図4、5ではA～B）、配列番号2（図6、7ではC～D）に示した配列を有するものである。本発明において、これらのDNA鎖によってコードされるポリペプチド（すなわちアミノ酸配列が実質的にIPPイソメラーゼであるタンパク質）は、前述のようなカロチノイド増量活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変化があってもよい。このことは、「アミノ酸配列が実質的に配列番号1、配列番号2に示した配列を有する」ということと対応している。たとえば、この酵素の第1番目のアミノ酸（Met）が欠失しているものなどもこのアミノ酸配列の変化によるポリペプチドないしは酵素に包含される。なお、

各ポリペプチドをコードする本発明DNA鎖は、配列番号1、2（図4、5、6、7）に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列をもつものの他に、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものであることはいうまでもない。

【0014】

DNA鎖の取得

上記のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA鎖を取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することであるが、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりもHaematococcus pluvialisまたはPhaffia rhodozymaなどのcDNAライブラリーを大腸菌で作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法、により、これを取得するほうが好ましいと言える。

【0015】

大腸菌などの微生物の形質転換および遺伝子発現

上述のような本発明DNA鎖を、適当なカロチノイド産生細菌（たとえば、Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成遺伝子群を含む大腸菌、Zymomonas mobilis）やカロチノイド産生酵母（たとえば、Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成遺伝子群を含むSaccharomyces cerevisiae）などの微生物に導入することにより、カロチノイド含量を増量させることができる。

【0016】

以下は、好ましい微生物への外来遺伝子の導入法の概要について記載したものである。

大腸菌等の微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法は、本発明において下記したところ以外のものにおいても、遺伝子工学の分野により慣用されているものを含み、その手法ないし方法（たとえば、“*Vectors for cloning genes*”, *Methods in Enzymology*, 216, p.469-631, 1992, Academic Press、および、“*Other bacterial systems*”, *Methods in Enzymology*, 204, p.305-636, 1991, Academic Press 参照）に準じて実施すればよい。

【0017】

＜大腸菌＞

大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい（たとえば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning-A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 参照）。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよいが（たとえば、前述の "Molecular cloning -A laboratory manual." 参照）、たとえば、pUC系やpBluescript 系等のlacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクターを用いて行うことができる。発明者等は、lacのプロモーター等を有する大腸菌用ベクター pSPORT1またはpBluescript II KSを用いて、lacのプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に、Haematococcus pluvialis、Phaffia rhodozyma、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子を挿入し、これらの遺伝子を大腸菌で発現させた。

【0018】

＜酵母＞

酵母Saccharomyces cerevisiae への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい（たとえば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照）。酵母での外来遺伝子の発現は、PGKやGPD等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、S. cerevisiae のベクター、たとえば、YRp系（酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター）、YEp系（酵母の2 μ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター）、YIp系（酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター）等のベクターに挿入することにより行うことができる（前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N.,

"Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, P.1112-1114, 1994 参照)。

【0019】

<Zymomonas mobilis>

エタノール生産細菌Zymomonas mobilisへの外来遺伝子の導入法は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができ、Zymomonas mobilisでの外来遺伝子の発現は、たとえばZymomonas mobilis用ベクターpZA22を用いて行うことができる(中村克己、「Zymomonas細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p.1016-1018, 1989、および、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991参照)。

【0020】

微生物によるカロチノイド生産量の増量法

前述した、微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手法ないし方法によって、カロチノイド合成遺伝子群およびIPPイソメラーゼ遺伝子を導入し、発現させることにより、多量のカロチノイドを生産できる微生物を得ることが可能となる。

ファルネシルピロリン酸(FPP)はカロチノイドだけでなく、セスキテルペン、トリテルペン、ステロール、ホパノールなどのテルペノイドと共通な基質である。一般に、微生物は、カロチノイドを合成できないものでも、テルペノイドは合成しているので、すべての微生物は、基本的に、中間代謝産物としてFPPを有しているはずである。一方、非光合成細菌Erwinia uredovoraのカロチノイド合成遺伝子群は、FPPを基質として、リコペン、 β -カロチン、ゼアキサンチンなどの有用カロチノイドまで合成させることが可能であり、海洋細菌Agrobacterium aurantiacumのカロチノイド合成遺伝子群と組み合わせることにより、カンタキサンチン、アスタキサンチンなどの有用カロチノイドまで合成させることが可能である(図2および図3参照)。発明者らは、大腸菌だけでなく前記した微生物

、すなわち、酵母Saccharomyces cerevisiae、エタノール生産細菌Zymomonas mobilisなどにErwinia uredovoraのcrt遺伝子群を導入し、これらの微生物が、予想どおり、 β -カロチンなどのカロチノイドを生産できるようになることを、すでに確認している [Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in Saccharomyces cerevisiae". Biosci. Biotech. Biochem., 58, P.1112-1114, 1994. Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of β -carotene in Zymomonas mobilis and Agrobacterium tumefaciens by introduction of the biosynthesis genes from Erwinia uredovora". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991. および、本発明者らによる特許出願特願平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」]

【0021】

したがって、Er. uredovora由来のカロチノイド合成遺伝子群や海洋細菌由来のカロチノイド合成遺伝子群（典型的には、Ag. aurantiacus由来のカロチノイド合成遺伝子群）を適当に組み合わせて同一の微生物に同時に導入することにより、原理的には、遺伝子導入発現系が確立しているすべての微生物に、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなどの有用カロチノイドを生産させることが可能となるはずである。

その際に、前述した方法により、IPPイソメラーゼ遺伝子（典型的には、Haematococcus pluvialis、Phaffia rhodozyma、または、Saccharomyces cerevisiaeなどのIPPイソメラーゼ遺伝子）を導入し、上記、カロチノイド合成遺伝子と同時に発現させることにより、有用カロチノイドの生産量を増量させることが可能となる。

【0022】

微生物の寄託

本発明DNA鎖である単離された遺伝子を組み込んだプラスミドを含む大腸菌JM109株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。括弧内はプラスミドの名称である。

(i) JM109 (pRH1)

寄託番号 : FERM BP-5032

受託年月日 : 平成7年3月6日

(ii) JM109 (pHP11)

寄託番号 : FERM BP-5031

受託年月日 : 平成7年3月6日

(iii) JM109 (pSI1)

寄託番号 : FERM BP-5033

受託年月日 : 平成7年3月6日

【0023】

【実施例】

以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。なお、ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に基づいている。

【0024】

【実施例1】 生物材料と培養条件

アスタキサンチン産生酵母 Phaffia rhodozyma は、American Type Culture Collection : ATCCに登録されている ATCC 24230株を用いた。Ph. rhodozyma を培養する培地として、YM培地 (酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%、バクトペプトン 0.5%、グルコース 1%) を用いた。アスタキサンチン産生緑藻 Haematococcus pluvialis は、財団法人 地球・人間環境フォーラム (Global Environmental Forum) に登録されている NIES-144 株を用いた。Ha. pluvialis を培養する培地として、基本培地 (酵母エキス 0.2%、酢酸ナトリウム 0.12%、L-アスパラギン 0.04%、塩化マグネシウム・六水和物 0.02%、硫酸第一鉄・七水和物 0.001%、塩化カルシウム・二水和物 0.002%) を用い、20℃、12時間明 (20 μ E/m²・s) / 12時間暗条件下で約4日間培養した。また、Ha. pluvialis のアスタキサンチン合成を誘導するために、シスト化という、いわゆる分化を誘導

しなければならない。シスト化の誘導条件としては、酢酸を最終濃度45 mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450 μ Mになるように加え、20℃、光強度 125 μ E/m²・sで約12時間培養した。実験室酵母Saccharomyces cerevisiaeは、Yeast Genetic Stock Center に登録されているS288C株を用いた。Sa. cerevisiaeを培養する培地として、YPD培地（酵母エキス 1%、バクトペプトン 2%、グルコース 2%）を用いた。

【0025】

〔実施例2〕 Phaffia rhodozymaの全RNAの調製

Phaffia rhodozyma ATCC 24230株を400 mlのYM培地に植菌して20℃、約24時間振盪培養した。培養液の濁度がOD600=0.4になったところで菌体を集菌し、液化窒素で凍結したものを-80℃の冷凍庫に保存して、これを全RNAの調製の材料とした。凍結した菌体を氷上で融解した後、6 mlのANEバッファ（10 mM 酢酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA :pH 6.0）を加え懸濁し、続いて界面上までガラスビーズを加えた。更に600 μ lの10% SDSと6 mlの65℃に温めたフェノールを加え、65℃で5分間保温した。この際30秒毎にボルテックスを行い、菌体を破碎した。保温後、室温まで素早く冷却して1500×g、10分間、室温で遠心分離した。上層を抽出して等量のフェノールを加え、2分間ボルテックスを行い、1500×g、10分間、室温で遠心分離した。続いて等量のフェノール：クロロホルム（1：1）、クロロホルムを用いて同上の操作を行った後、抽出した上層に10分の1量の3 M 酢酸ナトリウムと3倍量のエタノールを加え、-20℃の冷凍庫で30分間冷却した。15000 × g、15分間、4℃で遠心し、70%エタノールでリンスし、乾燥した後、200 μ lの滅菌水に溶解したものをPh. rhodozymaの全RNA溶液とした。この調製法で1.6 mgの全RNAが得られた。

【0026】

〔実施例3〕 Haematococcus pluvialisの全RNAの調製

Haematococcus pluvialis NIES-144 株を800 mlの基本培地に植菌して20℃、光強度20 μ E/m²・s、明暗サイクル12時間明／12時間暗条件下で約4日間培養し、続いて酢酸を最終濃度45 mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450 μ Mになるように加え、20℃、光強度125 μ E/m²・sで約12時間培養した。培養液から

菌体を集菌し、液化窒素で凍結して、乳鉢で菌体が粉末状になるまで破碎した。粉末状の破碎菌体に3 mlのISOGEN-LS [(株) ニッポンジーン] を加え、室温で5分間放置し、さらに0.8 mlのクロロホルムを加えた後、15秒間激しく攪拌して3分間、室温で放置した。12000×g、15分間、4℃で遠心分離して上層を抽出し、2 mlのイソプロパノールを加えて10分間、室温で放置後、12000×g、10分間、4℃で遠心分離した。続いて70%エタノールで沈殿物をリンスし、乾燥した後、1 mlのTE緩衝液 (10 mM トリス-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) に溶解したものを Ha. pluvialis の全RNA溶液とした。この調製法で4.1 mgの全RNAが得られた。

【0027】

〔実施例4〕 Phaffia rhodozyma 及び Haematococcus pluvialis のcDNA発現ライブラリーの作製

オリゴテックス-dT30スーパー [宝酒造(株)] を用いて Phaffia rhodozyma 及び Haematococcus pluvialis の各全RNA約1 mgからポリA+RNAをそれぞれ精製した。精製方法は、添付の製品説明書の使用方法に従った。この方法で Ph. rhodozyma では、約 26 µg、Ha. pluvialis では約 14 µgのポリA+mRNAを精製した。

cDNAの作製は、スーパースクリプト™プラスミドシステム (GIBCO BRL社) を用い、添付の説明書の使用方法を一部改変して以下の通りに行った。約 5 µgのポリA+mRNAを用い、制限酵素NotIの認識配列と15mersのオリゴdTからなる合成DNAをプライマーとして逆転写酵素SUPERSCRIPT RTで相補鎖DNAを合成し、続いて Escherichia coli DNA リガーゼ、E.coli DNA ポリメラーゼ、E.coli DNA RNase Hを用いて2本鎖cDNAを合成した後、制限酵素SalIのリンカーをT4 DNA リガーゼで結合させ、最終的にcDNAの上流末端がSalI部位、ポリAの下流がNotI 部位になるように作製した。電気泳動法を用いて、これらcDNAのサイズ分画を行い、0.7 kb~3.5 kbの範囲の分画を集めた。この分画のcDNAとcDNA発現ベクターpSPORT I

NotI-SalI-Cut とを上キットに含まれているライゲーションバッファー (50 mM トリス-HCl pH 7.6, 10m M MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% PEG 8000) 及びT4 DNA リガーゼを用いてライゲーションした。このcDNA発現ベクターpSPORT Iは、SalI 部位の上流にlacプロモーターをもち、大腸菌内でcDNAを発現させることができるベクターである。次にライゲーションしたDNA溶液を全て使って、Molecul

ar Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory ,1.21-1.41 (1989)

の方法に従って調製した大腸菌 (*E. coli*) DH5 α のコンピテントセルの形質転換を行った。*Ph. rhodozyma*で約20万個、*Ha. pluvialis*で約4万個の形質転換株が得られ、これらを全て集めた後、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory ,1.21-1.41 (1989) の方法に従い、プラスミドDNAを調製した。その結果、各々0.9 mg、0.6 mgのプラスミドDNAが得られ、これをそれぞれ*Ph. rhodozyma*及び*Ha. pluvialis*のcDNA発現ライブラリーとした。

【0028】

〔実施例5〕 カロチノイドを産生する大腸菌の作製

*Erwinia uredovora*の*crtZ* 以外のカロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミドpCAR16 [Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K., "Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology, 172, p.6704-6712, 1990、及び本発明者らによる特許出願特開平3-58786号公報（特願平2-53255号明細書）：「カロチノイドの合成に有用なDNA鎖」] の*BstEII* 消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、*crtX*遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、 β -カロチン産生に必要な*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*遺伝子（図2）を含む6.0 kb *Asp718*(*KpnI*)-*EcoRI*断片を切り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184の*EcoRV*部位に挿入し、目的とするプラスミド（pACCAR16 Δ *crtX*と命名、図10）を得た。このpACCAR16 Δ *crtX*を有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示し、かつ β -カロチンを生産して黄色の色調を示す。

【0029】

次に、プラスミドpCAR16の*BstEII*/*SnaBI*消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、*crtX*と*crtY*遺伝子を含む2.26 kb *BstEII*-*SnaBI*断片を取り除いた後、リコペン産生に必要な*crtE*, *crtB*, *crtI*遺伝子（図2）を含む3.75 kb *Asp718* (*KpnI*)-*EcoRI*断片を切り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184の*EcoRV* 部位に挿入し、目的とするプラスミド（pACCRT-EIBと命名、図10）を得た。このpACCRT-EIBを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示し、かつ

リコペンを生産して赤色の色調を示す (Cunningham Jr, F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gatt, E., Hirschberg, J., "Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene". FEBS Lett., 328, 130-138, 1993)。

【0030】

次に、プラスミドpCAR16のBstEII/Eco52I消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、crtX, crtY, crtI遺伝子を含む3.7 kb BstEII-Eco52I断片を取り除いた後、フィトエン産生に必要なcrtE, crtB遺伝子 (図2) を含む2.3 kb Asp718 (KpnI)-EcoRI断片を切り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184のEcoRV 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCRT-EBと命名、図10) を得た。このpACCRT-EBを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示すが、フィトエンは無色のため、色調には変化はない (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., "Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenoids". Z. Naturforsch., 46c, 1045-1051, 1991)。

【0031】

【実施例6】 β -カロチン産生量を増加させる遺伝子のスクリーニング

上記プラスミドpACCAR16 Δ crtXを保持する大腸菌JM101が β -カロチンを産生して黄色くなることを利用して、この大腸菌にPhaffia rhodozymaまたはHaematococcus pluvialisのcDNA発現ライブラリーを導入することで、より黄色の色調が濃くなった形質転換体が現われるかどうかの検討を行った。まず、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory, 1.21-1.41 (1989)の方法を用い、pACCAR16 Δ crtXを保持する大腸菌JM101のコンピテントセルを作製した。次に、このコンピテントセル 1 mlに対してPh. rhodozymaおよびHa. pluvialisのcDNA発現ライブラリーを各100ngずつを導入し、それぞれ約20万個および約4万個の形質転換体を、150 μ g/mlのアンピシリン、30 μ g/mlのクロラムフェニコール、1 mMのIPTGを含むLBプレート (1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、

1% NaCl、1.5%寒天) 上に蒔くことによるスクリーニングを行い、他の株より黄色の色調が濃い株を *Ph. rhodozyma* で5株、*Ha. pluvialis* で10株、単離することができた。これらの株からプラスミドDNAを抽出して制限酵素分析を行った結果、各々の5株、10株は、それぞれ共通のDNA断片を含んでいることがわかった。なお、これらのcDNA発現ライブラリーに由来するプラスミドのうち、*Ph. rhodozyma* 由来のプラスミドの1つをpRH1 (図11)、*Ha. pluvialis* 由来のプラスミドの1つをpHP1と命名し、さらにpHP1を *SalI* と *NotI* で消化してcDNA断片部分を取り出し、pBluescriptII KS+に挿入したものをpHP11 (図11) と命名し、これらのプラスミドを以後の実験に用いた。

【0032】

【実施例7】 β -カロチン産生量を増加させる遺伝子の塩基配列決定

プラスミドpRH1、pHP1について以下の手順で種々の長さの欠失を有するデレーションプラスミドの作製を行い、それらを用いて塩基配列の決定を行った。pRH1は *EcoRI* と *PstI* または *NotI* と *SphI* で分解し、pHP1は *AatII* と *BamHI* または *KpnI* と *EcoRI* で分解した後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100 μ lのExoIIIバッファー (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-メルカプトエタノール, pH 8.0) に溶解し、180ユニットのExoIIIヌクレアーゼを加えて37℃で保温した。30秒ごとに10 μ lをサンプリングして、10 μ lのMBバッファー (40 mM NaCl, 2 mM $ZnCl_2$, 10%グリセロール, pH 4.5) の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得られた10本のチューブを65℃、10分間保温して酵素を失活させた後、5ユニットのマンガベーンヌクレアーゼを加えて37℃で30分保温した。さらに、アガロースゲル電気泳動により、1つのプラスミド由来のものについて10種のそれぞれ欠失の程度が異なるDNA断片を回収した。回収したDNAはKlenow酵素により末端を平滑化し、16℃、一晚ライゲーション反応した後、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた種々のクローンについてプラスミドを調製し、アプライドバイオシステム (株) の蛍光プライマーサイクルシーケンスキットを用いてシーケンシング反応を行い、自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

【0033】

その結果、pRH1のPhaffia rhodozyma由来cDNAは1099塩基対 (bp) の塩基配列からなり (配列番号4)、251アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームが存在することがわかった (図4~5におけるAからBに対応)。pHP1のHaematococcus pluvialis由来cDNAは1074 bpの塩基配列からなり (配列番号5)、259アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームが存在することがわかった (図6~7 におけるCからDに対応)。このオープン・リーディング・フレームから予想されたアミノ酸配列をGene Bankにて相同性を検索した結果、Ph. rhodozymaおよびHa. pluvialisのアミノ酸配列は、両方とも、それぞれ、そのアミノ酸配列がすでに報告されているSaccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子 (Anderson, M. S., Muehlbacher, M., Street, I. P., Profitt, J., Poulter, C. D., "Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase -an improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem., 264, P.19169-19175, 1989 参照) と27.0%および20.3%のアイデンティティーという高い相同性を有していることがわかったので、IPPイソメラーゼ遺伝子であると同定された。

【0034】

【実施例8】 Saccharomyces cerevisiaeの全DNAの調製

Saccharomyces cerevisiaeの全DNAの調製は、Methods in Yeast Genetics; a laboratory course manual : Cold Spring Harbor Laboratory, p131-132 (1990) に示された方法で以下の様に行った。Sa. cerevisiae S288Cを10 mlのYPD培地に植菌し、一晩、30℃で培養した。培養した菌体を集菌し、0.5 mlの滅菌水で懸濁して洗浄した。再度、菌体を集菌して上清を取り除き、0.2 mlの2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM EDTAと0.2 mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)と0.3gのガラスビーズを加え、3~4分間ボルテックスにかけた後、0.2 mlのTE buffer (10mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM EDTA)を加えた。5分間遠心分離した後、上層を移して1 mlのエタノールを加え、再度、2分間の遠心分離を行った。得られた沈殿物を0.4 mlのTE bufferに溶解し、2 μ lの10mg/mlのRNase Aを加えてから、5分間37℃に放置した。次

に10 μ lの4 M 酢酸アンモニウムと1 mlのエタノールを加え、よく混合した後、2分間遠心して沈殿物を回収した。沈殿物を乾燥した後、50 μ lのTE bufferに溶解してSa. cerevisiae S288Cの全DNAとした。この操作で、3.4 μ gの全DNAが得られた。

【0035】

【実施例9】 PCR法によるSaccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子の単離

前述の文献 (Anderson, M. S., Muehlbacher, M., Street, I. P., Profitt, J., Poulter, C. D., "Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase -an improved purification of the enzyme and isolation of the gene from Saccharomyces cerevisiae". J. Biol. Chem., 264, P.19169-19175, 1989) に報告されているSa. cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列をもとに、以下のプライマーを合成した。

プライマーNo.1 5'-TCGATGGGGGTTGCCTTCTTTTTCGG-3'

プライマーNo.2 5'-CGCGTTGTTATAGCATTCTATGAATTGCC-3'

【0036】

PCRで増幅するIPPイソメラーゼ遺伝子上流側末端がTaqI 部位、下流側末端がAccII部位になるようにデザインした。PCRは、200ngのSa. cerevisiae全DNAとPfuDNAポリメラーゼ (STRATAGENE)を使って30サイクルで行った。PCRで得られたIPPイソメラーゼ遺伝子を大腸菌内で発現させるために、TaqI とAccIで消化し、ベクターpBluescriptII KS+ のClaI 部位とSmaI 部位に挿入した。このプラスミドをpSI1と命名した (図11)。このSa. cerevisiae由来DNAは1058bpの塩基配列からなり (配列番号6)、288アミノ酸からなるIPPイソメラーゼをコードする遺伝子が存在していた (図8~9におけるEからFに対応)。

【0037】

【実施例10】 IPPイソメラーゼ遺伝子導入によるリコペン生産量の増量

ベクターpSPORT1、Phaffia rhodozymaのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1、Haematococcus pluvialisのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpHP11、および、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラ

スミドpSI1 (図11) を、それぞれ、pACCRT-EIB (図10) を含むリコペン生産大腸菌JM101 (以後、L:と簡略化して表す) に導入し、150 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン (Ap)、30 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコール (Cm)、1 mMのIPTGを含むLBプレート上にプレーティングし、28℃で一晩培養を行った。その結果、3種類のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むものは、いずれも、ベクターのみが入ったコントロールと比べて、リコペン産生による赤色はかなり濃くなることがわかった。さらに、これらの大腸菌の生育速度は、コントロールよりも早く、培養中、常に、コントロールより大きなコロニーを形成していた。これは、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入、発現により、FPPまでの上流の経路 (図1参照) が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、リコペンの増量に結びついたと考察することができ、さらに、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールより増殖速度が早くなったのは、FPPの増量により、リコペン増量だけでなく、大腸菌の生育に必要なFPP由来の膜成分 (たとえば、FPPやGGPP結合タンパク質) にも十分量、基質を供給できるようになったためではないかと考えることができる。

【0038】

IPPイソメラーゼ遺伝子の導入によるリコペン生産量の増量はさらに液体培養によっても確かめられた。5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28℃、一晩振盪培養したものから、その2 mlを200 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地 (1.6%バクトトリプトン、1%酵母エキス、0.5%NaCl) で28℃、230 rpm で振盪培養を行った。数時間ごとに5 mlづつサンプリングを行い、生育速度とリコペン含量の測定を行った。生育速度は、650 nmの吸光度を測定することにより求めた。リコペン含量は以下のようにして求めた。すなわち、遠心分離により細胞を集め、2.5 mlのアセトンを加え、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過を行った後、474 nmの吸光度を測定し、リコペン1 mM, 1 cmセルあたりの吸光度が185.0としてリコペン含量の定量を行った。分光光度計は、JASCO UVIDECE-220Bを用いた。なお、これらの株が本当にリコペンを生産しており、474 nmの吸光度はリコペンに起因していることを、HPLCにより確認した。この条件は、実施例11に示されている。結果を、図12 (生育曲線)、図13 (リコペン生産曲線) に示した。生育速度 (図12) においては、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコン

トロールも含めて、いずれの株も、差は認められなかった。この結果は、前述のプレート上での結果と異なっている。おそらく、液体培養の場合は、寒天培養と違って、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールにおいても、大腸菌の生育に必要なFPP由来の膜成分（たとえば、FPPやGGPP結合タンパク質）への基質の供給に余裕があるためであると考えることができる。一方、リコペンの生産においては、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールと、他のIPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株とは、大きな差が見られた。IPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株は、培養中、常に、コントロールより、数倍高いリコペンの生産量を示した。培養28時間後のリコペン生産量を大腸菌菌体あたりの重さ（乾重量）で示したのが、図14である。IPPイソメラーゼ遺伝子を含む3株は、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの3.6～4.5倍の生産量を示した。なお、pHP11を含むリコペン産生大腸菌では、乾重量1 gあたり1.03 mg のリコペンを生産することができた。

【0039】

【実施例11】 IPPイソメラーゼ遺伝子導入による β -カロチン生産量の増量

ベクターpSPORT1および*Phaffia rhodozyma*のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1を、それぞれ、pACCAR16 Δ crtX（図10）を含む β -カロチン産生大腸菌JM101（以後、 β :と簡略化して表す）に導入したものを5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28℃、一晚振盪培養したものから、その1 mlを100 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地で28℃、230 rpmで、28時間、振盪培養を行った。遠心分離により、これらから菌体を集め、0.85% NaClで洗った後、40 mlのアセトンに懸濁し、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過した後、454 nmの吸光度を測定し、 β -カロチン 1 mM, 1 cmセルあたりの吸光度が134.4として β -カロチン含量の定量を行った。その結果を図14に示した。pRH1を含む β -カロチン産生大腸菌は、乾重量1 gあたり709 μ gの β -カロチンを生産し、これは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの1.5倍の値を示した。

【0040】

さらに、上記のアセトン抽出液を用いて、これらの株が本当に β -カロチンを生産しており、454 nmの吸光度は β -カロチンに起因していることを、HPLCによ

り確認した。すなわち、カラムとして、ノバパックHR 6 μ C18 (3.9 \times 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いて、アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール (90/6/4) で展開を行い、フォトダイオードアレイ検出器996 (ウォーターズ社製) によりモニターを行った。その結果、可視部のピークのほぼ100%が β -カロチンであった。なお、 β -カロチンの標品として、シグマ製の β -カロチン有機合成品を用いた。

【0041】

【実施例12】 IPPイソメラーゼ遺伝子導入によるフィトエン生産量の増量

ベクターpSPORT1、*Phaffia rhodozyma*のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpRH1、及び、*Haematococcus pluvialis*のIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpHP11を、それぞれ、pACCRT-EB (図10) を含むフィトエン産生大腸菌JM101 (以後、P:と簡略化して表す) に導入したものを5 mlのAp, Cmを含むLB培地で、28 $^{\circ}$ C、一晚振盪培養したものから、その1 mlを100 mlのAp, Cm, 0.1 mMのIPTGを含む2YT培地で28 $^{\circ}$ C、230 rpmで、28時間、振盪培養を行った。遠心分離により、これらから菌体を集め、0.85% NaClで洗った後、40 mlのアセトンに懸濁し、30分間放置した。この間、時折、ボルテックスにかけた。濾過した後、ロータリーエバポレーターによる乾燥後、40 mlの石油エーテルと水で分配を行い、エーテル層の286nmの吸光度を測定し、フィトエン 1 mM, 1 cmセルあたりの吸光度が41.2としてフィトエン含量の定量を行った。また、実施例11に示したHPLCを行った結果、286nmの吸光度の70%がフィトエンに起因することがわかったので、上記の定量値の70%をフィトエン含量とした。結果を図14に示した。IPPイソメラーゼ遺伝子を含むフィトエン産生大腸菌は、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールの1.7~2.1倍の生産量を示した。

【0042】

以上の実施例により、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入により、 β -カロチン、リコペン、及び、フィトエン産生大腸菌における、これらのカロチノイドの生産量が、実際に、数倍増量することを示した。これは、IPPイソメラーゼ遺伝子の導入、発現により、FPPまでの上流の経路 (図1参照) が太くなり、結果的にFPPの供給量が増えることにより、これらのカロチノイドの増量に結びついたと考えら

れので、ここで示したβ-カロチン、リコペン、フィトエンだけでなく、他にも、アスタキサンチン、ゼアキサンチンなど、すべてのカロチノイドに当てはまると考えることができる。

【0043】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：251

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Ser	Met	Pro	Asn	Ile	Val	Pro	Pro	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Glu	Gly			
						5				10					15			
Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gln	Val	Arg	Leu	Met	Glu	Glu			
			20						25						30			
Arg	Cys	Ile	Leu	Val	Asn	Pro	Asp	Asp	Val	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ala	Ser			
			35						40						45			
Lys	Lys	Thr	Cys	His	Leu	Met	Ser	Asn	Ile	Asn	Ala	Pro	Lys	Asp	Leu			
			50					55							60			
Leu	His	Arg	Ala	Phe	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Arg	Pro	Ser	Asp	Gly	Ala			
			65				70								80			
Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Thr	Phe	Pro	Gly	Met			
			85							90					95			
Trp	Thr	Asn	Thr	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Ile	Lys	Gly	Glu	Val			
			100						105						110			
Glu	Glu	Glu	Asn	Gln	Ile	Gly	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	Ser	Arg	Lys	Leu			
			115						120						125			
Glu	His	Glu	Leu	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Asp	Ser	Phe			

130	135	140
Thr Tyr Leu Thr Arg Ile His Tyr Leu Ala Pro Ser Asp Gly Leu Trp		
145	150	155
Gly Glu His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Ser Thr Thr Pro Thr Glu		
	165	170
His Thr Gly Asn Pro Asn Glu Val Ser Asp Thr Arg Tyr Val Thr Lys		
	180	185
Pro Glu Leu Gln Ala Met Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro		
	195	200
Trp Phe Lys Leu Ile Ala Arg Asp Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln		
	210	215
Leu Leu Ala Arg Arg Asn Glu Lys Gly Glu Val Asp Ala Lys Ser Leu		
225	230	235
Glu Asp Leu Ser Asp Asn Lys Val Trp Lys Met ***		
	245	250

【0044】

配列番号：2

配列の長さ：259

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Gln Leu Leu Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser
5 10 15
Thr Trp Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu
20 25 30
Cys Ile Leu Val Asp Ala Asp Asp Asn Ile Thr Gly His Val Ser Lys
35 40 45

Leu Glu Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His
 50 55 60
 Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe Pro Ser Val Trp Thr Asn
 85 90 95
 Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro Asp Glu Val Asp
 100 105 110
 Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu
 130 135 140
 Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Val Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu
 165 170 175
 Met Asp Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn
 180 185 190
 Pro Asp Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg
 195 200 205
 Gln Met Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg
 210 215 220
 Ile Ile Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp Trp Ala Asp Leu Asp Ala
 225 230 235 240
 Ala Leu Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr Val His His Ile
 245 250 255
 Asn Glu Ala ***

【0045】

配列番号：3

配列の長さ : 288

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

```

Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser Tyr
      5              10              15
Ala Lys Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu Phe
      20              25              30
Pro Glu Ile Ile Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser Glu
      35              40              45
Thr Ser Asn Asp Glu Ser Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp Glu
      50              55              60
Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp Asp
      65              70              75              80
Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys Val Cys His Leu Met Glu
      85              90              95
Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Ile Phe
      100             105             110
Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu Lys Ile
      115             120             125
Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Cys
      130             135             140
Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile Lys
      145             150             155             160
Gly Ala Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile
      165             170             175
Pro Glu Asp Glu Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn Arg

```

	180	185	190
Ile His Tyr Met Ala Pro Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu Ile			
195	200	205	
Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr Val			
210	215	220	
Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe Lys Trp Val Ser Pro Asn			
225	230	235	240
Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys Phe Thr Pro Trp			
245	250	255	
Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu Gln Leu			
260	265	270	
Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met Leu			
275	280	285	

【0046】

配列番号：4

配列の長さ：1099

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：Phaffia rhodozyma

株名：ATCC 24230

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：99. . 851

特徴を決定した方法：E

配列

CCCACGCGTC CGCACATCTC GCATATATCA CTTTCCTCCT TCCAGAACAA GTTCTGAGTC 60

AACCGAAAAG AAAGAAGGCA GAGGAAAATA TATTCTAG ATG TCC ATG CCC AAC ATT 116

Met Ser Met Pro Asn Ile

5

GTT CCC CCC GCC GAG GTC CGA ACC GAA GGA CTC AGT TTA GAA GAG TAC 164

Val Pro Pro Ala Glu Val Arg Thr Glu Gly Leu Ser Leu Glu Glu Tyr

10

15

20

GAT GAG GAG CAG GTC AGG CTG ATG GAG GAG CGA TGT ATT CTT GTT AAC 212

Asp Glu Glu Gln Val Arg Leu Met Glu Glu Arg Cys Ile Leu Val Asn

25

30

35

CCG GAC GAT GTG GCC TAT GGA GAG GCT TCG AAA AAG ACC TGC CAC TTG 260

Pro Asp Asp Val Ala Tyr Gly Glu Ala Ser Lys Lys Thr Cys His Leu

40

45

50

ATG TCC AAC ATC AAC GCG CCC AAG GAC CTC CTC CAC CGA GCA TTC TCC 308

Met Ser Asn Ile Asn Ala Pro Lys Asp Leu Leu His Arg Ala Phe Ser

55

60

65

70

GTG TTT CTC TTC CGC CCA TCG GAC GGA GCA CTC CTG CTT CAG CGA AGA 356

Val Phe Leu Phe Arg Pro Ser Asp Gly Ala Leu Leu Leu Gln Arg Arg

75

80

85

GCG GAC GAG AAG ATT ACG TTC CCT GGA ATG TGG ACC AAC ACG TGT TGC 404

Ala Asp Glu Lys Ile Thr Phe Pro Gly Met Trp Thr Asn Thr Cys Cys

90

95

100

AGT CAT CCT TTG AGC ATC AAG GGC GAG GTT GAA GAG GAG AAC CAG ATC 452

Ser His Pro Leu Ser Ile Lys Gly Glu Val Glu Glu Glu Asn Gln Ile

105

110

115

GGT GTT CGA CGA GCT GCG TCC CGA AAG TTG GAG CAC GAG CTT GGC GTG 500

Gly Val Arg Arg Ala Ala Ser Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Val

120	125	130	
CCT ACA TCG TCG ACT CCG CCC GAC TCG TTC ACC TAC CTC ACT AGG ATA			548
Pro Thr Ser Ser Thr Pro Pro Asp Ser Phe Thr Tyr Leu Thr Arg Ile			
135	140	145	150
CAT TAC CTC GCT CCG AGT GAC GGA CTC TGG GGA GAA CAC GAG ATC GAC			596
His Tyr Leu Ala Pro Ser Asp Gly Leu Trp Gly Glu His Glu Ile Asp			
155	160	165	
TAC ATT CTC TTC TCA ACC ACA CCT ACA GAA CAC ACT GGA AAC CCT AAC			644
Tyr Ile Leu Phe Ser Thr Thr Pro Thr Glu His Thr Gly Asn Pro Asn			
170	175	180	
GAA GTC TCT GAC ACT CGA TAT GTC ACC AAG CCC GAG CTC CAG GCG ATG			692
Glu Val Ser Asp Thr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Glu Leu Gln Ala Met			
185	190	195	
TTT GAG GAC GAG TCT AAC TCA TTT ACC CCT TGG TTC AAG TTG ATT GCC			740
Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Ala			
200	205	210	
CGA GAC TTC CTG TTT GGC TGG TGG GAT CAA CTT CTC GCC AGA CGA AAT			788
Arg Asp Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asn			
215	220	225	230
GAA AAG GGT GAG GTC GAT GCC AAA TCG TTG GAG GAT CTC TCG GAC AAC			836
Glu Lys Gly Glu Val Asp Ala Lys Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asp Asn			
235	240	245	
AAA GTC TGG AAG ATG TAGTCGACC CTTCTTTCTG TACAGTCATC TCAGTTCGCC			890
Lys Val Trp Lys Met ***			
250			
TGTTGGTTGC TTGCTTCTTG CTCTTCTTTC TATATATCTT TTTTCTTGCC TGGGTAGACT			950
TGATCTTTCT ACATAGCATA CGCATACATA CATAAACTCT ATTTCTTGTT CTTTATCTCT			1010

CTTCTAAGGG AATCTTCAAG ATCAATTTCT TTTTGGGCTA CAACATTTC AATCAATGTT 1070

GCTTTTCAGA CTACAAAAAA AAAAAAAA 1099

【0047】

配列番号：5

配列の長さ：1074

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：Haematococcus pluvialis

株名：NIES-144

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：145 . . 921

特徴を決定した方法：E

配列

ATCGCTACTT GGAACCTGGC CCGCGGGCAG TCCGATGACG CGATGCTTCG TTCGTTGCTC 60

AGAGGCCTCA CGCATTTCCT CCGCGTGAAC TCCGCGCAGC AGCCCAGCTG TGCACACGCG 120

CGACTCCAGT TTAGGCCAG AAGC ATG CAG CTG CTT GCC GAG GAC CGC ACA GAC 179

Met Gln Leu Leu Ala Glu Asp Arg Thr Asp

5

10

CAT ATG AGG GGT GCA AGT ACC TGG GCA GGC GGG CAG TCG CAG GAT GAG 222

His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu

15

20

25

CTG ATG CTG AAG GAC GAG TGC ATC TTG GTG GAT GCT GAC GAC AAC ATT	270
Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile Leu Val Asp Ala Asp Asp Asn Ile	
30 35 40	
ACA GGC CAT GTC AGC AAG CTG GAG TGC CAC AAG TTC CTA CCA CAT CAG	318
Thr Gly His Val Ser Lys Leu Glu Cys His Lys Phe Leu Pro His Gln	
45 50 55	
CCT GCA GGC CTG CTG CAC CGG GCC TTC TCT GTA TTC CTG TTT GAC GAC	366
Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Asp	
60 65 70	
CAG GGG CGA CTG CTG CTG CAA CAG CGT GCA CGA TCA AAA ATC ACA TTC	414
Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe	
75 80 85 90	
CCC AGT GTG TGG ACC AAC ACC TGC TGC AGC CAC CCT CTA CAT GGG CAG	462
Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln	
95 100 105	
ACC CCA GAT GAG GTG GAC CAA CTA AGC CAG GTG GCC GAC GGC ACA GTA	510
Thr Pro Asp Glu Val Asp Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val	
110 115 120	
CCT GGC GCA AAG GCT GCT GCC ATC CGC AAG TTG GAG CAC GAG CTG GGG	558
Pro Gly Ala Lys Ala Ala Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly	
125 130 135	
ATA CCA GCG CAC CAG CTG CCG GCC AGC GCG TTT CGC TTC CTC ACG CGT	606
Ile Pro Ala His Gln Leu Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg	
140 145 150	
TTG CAC TAC TGC GCC GCG GAC GTG CAG CCG GCT GCG ACA CAA TCA GCA	654
Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala	
155 160 165 170	
CTC TGG GGC GAG CAC GAA ATG GAC TAC ATC TTA TTC ATC CGG GCC AAC	702
Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp Tyr Ile Leu Phe Ile Arg Ala Asn	

175	180	185	
GTC ACC CTT GCG CCC AAC CCT GAC GAG GTG GAC GAA GTC AGG TAC GTG	750		
Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp Glu Val Asp Glu Val Arg Tyr Val			
190	195	200	
ACG CAG GAG GAG CTG CGG CAG ATG ATG CAG CCG GAC AAT GGG TTG CAA	798		
Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met Met Gln Pro Asp Asn Gly Leu Gln			
205	210	215	
TGG TCG CCG TGG TTT CGC ATC ATC GCC GCG CGC TTC CTT GAG CGC TGG	846		
Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp			
220	225	230	
TGG GCT GAC CTA GAC GCG GCC CTG AAC ACT GAC AAA CAC GAG GAT TGG	894		
Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp			
235	240	245	250
GGA ACG GTG CAT CAC ATC AAC GAA GCG TGA AAACAG AAGCTGTAGG	940		
Gly Thr Val His His Ile Asn Glu Ala ***			

255
 ATGTCAAGAC ACGTCATGAG GGGGCTTGGC ATCTTGCGG CTTCGTATCT CTTTTTACTG 1000

AGACTGAACC TGCAGCTGGA GACAATGGTG AGCCCAATTC AACTTTCCGC TGCAGTGGAA 1060

AAAAAAAAAA AAAA 1074

【0048】

配列番号：6

配列の長さ：1058

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genome DNA

起源

生物名 : *Saccharomyces cerevisiae*

株名 : S288C

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 187 . . 1050

特徴を決定した方法 : S

配列

```

TCGATGGGGG TTGCCTTTCT TTTTCGGTCT TAACTCCATT TATATTTATT TATTCATTTT   60

TATCTATTTA ACAGGAAACA GTTTTCTAGT GACAAGAAGG CGTATATCCC ACTTAATTCA   120

ATATTAGAGT ATTTCGTATTT GGAATACAGG AAGAGTAAAA ATAAGCCAAA AATTCATTAC   180

ACCTCA ATG ACT GCC GAC AAC AAT AGT ATG CCC CAT GGT GCA GTA TCT AGT 231
      Met Thr Ala Asp Asn Asn Ser Met Pro His Gly Ala Val Ser Ser
                5                10                15

TAC GCC AAA TTA GTG CAA AAC CAA ACA CCT GAA GAC ATT TTG GAA GAG   279
Tyr Ala Lys Leu Val Gln Asn Gln Thr Pro Glu Asp Ile Leu Glu Glu
                20                25                30

TTT CCT GAA ATT ATT CCA TTA CAA CAA AGA CCT AAT ACC CGA TCT AGT   327
Phe Pro Glu Ile Ile Pro Leu Gln Gln Arg Pro Asn Thr Arg Ser Ser
                35                40                45

GAG ACG TCA AAT GAC GAA AGC GGA GAA ACA TGT TTT TCT GGT CAT GAT   375
Glu Thr Ser Asn Asp Glu Ser Gly Glu Thr Cys Phe Ser Gly His Asp
                50                55                60

GAG GAG CAA ATT AAG TTA ATG AAT GAA AAT TGT ATT GTT TTG GAT TGG   423
Glu Glu Gln Ile Lys Leu Met Asn Glu Asn Cys Ile Val Leu Asp Trp
                65                70                75

```

GAC GAT AAT GCT ATT GGT GCC GGT ACC AAG AAA GTT TGT CAT TTA ATG	471
Asp Asp Asn Ala Ile Gly Ala Gly Thr Lys Lys Val Cys His Leu Met	
80 85 90 95	
GAA AAT ATT GAA AAG GGT TTA CTA CAT CGT GCA TTC TCC GTC TTT ATT	519
Glu Asn Ile Glu Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Ile	
100 105 110	
TTC AAT GAA CAA GGT GAA TTA CTT TTA CAA CAA AGA GCC ACT GAA AAA	567
Phe Asn Glu Gln Gly Glu Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Thr Glu Lys	
115 120 125	
ATA ACT TTC CCT GAT CTT TGG ACT AAC ACA TGC TGC TCT CAT CCA CTA	615
Ile Thr Phe Pro Asp Leu Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu	
130 135 140	
TGT ATT GAT GAC GAA TTA GGT TTG AAG GGT AAG CTA GAC GAT AAG ATT	663
Cys Ile Asp Asp Glu Leu Gly Leu Lys Gly Lys Leu Asp Asp Lys Ile	
145 150 155	
AAG GGC GCT ATT ACT GCG GCG GTG AGA AAA CTA GAT CAT GAA TTA GGT	711
Lys Gly Ala Ile Thr Ala Ala Val Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly	
160 165 170 175	
ATT CCA GAA GAT GAA ACT AAG ACA AGG GGT AAG TTT CAC TTT TTA AAC	759
Ile Pro Glu Asp Glu Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn	
180 185 190	
AGA ATC CAT TAC ATG GCA CCA AGC AAT GAA CCA TGG GGT GAA CAT GAA	807
Arg Ile His Tyr Met Ala Pro Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu	
195 200 205	
ATT GAT TAC ATC CTA TTT TAT AAG ATC AAC GCT AAA GAA AAC TTG ACT	855
Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr	
210 215 220	
GTC AAC CCA AAC GTC AAT GAA GTT AGA GAC TTC AAA TGG GTT TCA CCA	903
Val Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe Lys Trp Val Ser Pro	

225 230 235
 AAT GAT TTG AAA ACT ATG TTT GCT GAC CCA AGT TAC AAG TTT ACG CCT 951
 Asn Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys Phe Thr Pro
 240 245 250 255
 TGG TTT AAG ATT ATT TGC GAG AAT TAC TTA TTC AAC TGG TGG GAG CAA 999
 Trp Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu Gln
 260 265 270
 TTA GAT GAC CTT TCT GAA GTG GAA AAT GAC AGG CAA ATT CAT AGA ATG 1047
 Leu Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met
 275 280 285
 CTA TAA CAACG 1058
 Leu ***

【0049】

【発明の効果】

本発明によれば、微生物によるカロチノイドの生合成において、その生産量を有意に増量させることのできるDNA鎖、ならびに該DNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入し、発現させることにより、その微生物のカロチノイド生産量を数倍上げることができる方法が提供される。該DNA鎖は、カロチノイドだけでなく、カロチノイドと共通の基質（FPP）を有するテルペノイド等の微生物による生産に応用して同様な生産量の増量が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 HMG-CoAからFPPにいたるイソプレレン基本生合成経路を示す。

【図2】 非光合成細菌Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す。

【図3】 海洋細菌Agrobacterium aurantiacumのカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す。実線は主要な生合成経路、点線はマイナーな生合成経路を表す。

【図4】 アスタキサンチン産生酵母Phaffia rhodozymaのIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記

号AからBは、251アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

【図5】 図4の配列の続きを示す。

【図6】 アスタキサンチン産生緑藻Haematococcus pluvialisのIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記号CからDは、259アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

【図7】 図6の配列の続きを示す。

【図8】 実験室酵母Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。図中、記号EからFは、288アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレームを表す。

【図9】 図8の配列の続きを示す。

【図10】 非光合成細菌Erwinia uredovoraのカロチノイド生合成遺伝子を含むプラスミドを示す。

【図11】 Phaffia rhodozyma、Haematococcus pluvialis、Saccharomyces cerevisiaeのIPPイソメラーゼ遺伝子を含むプラスミドを示す。

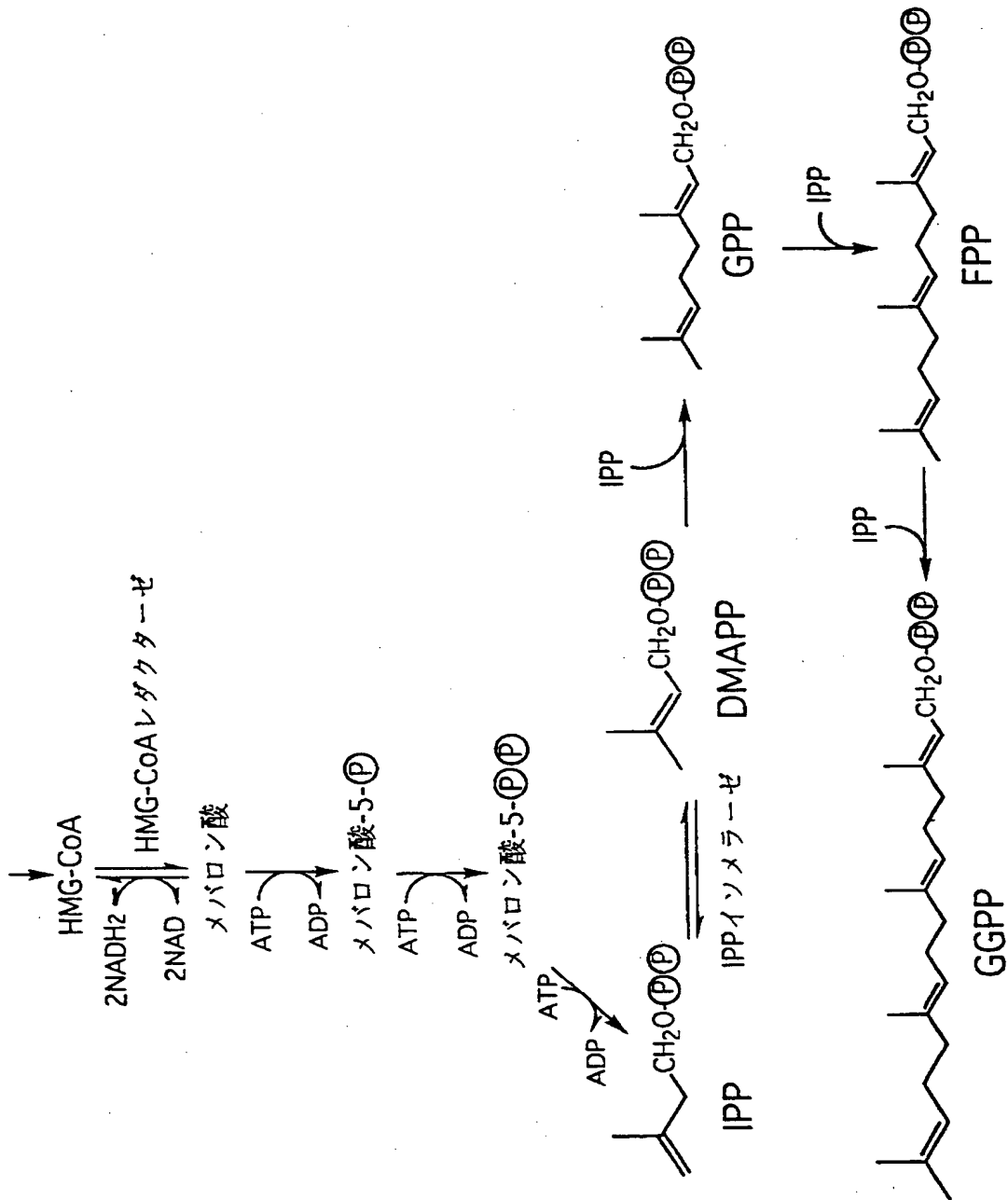
【図12】 リコペン産生各種大腸菌 (L:) の生育曲線を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

【図13】 リコペン産生各種大腸菌 (L:) のリコペン生産曲線を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

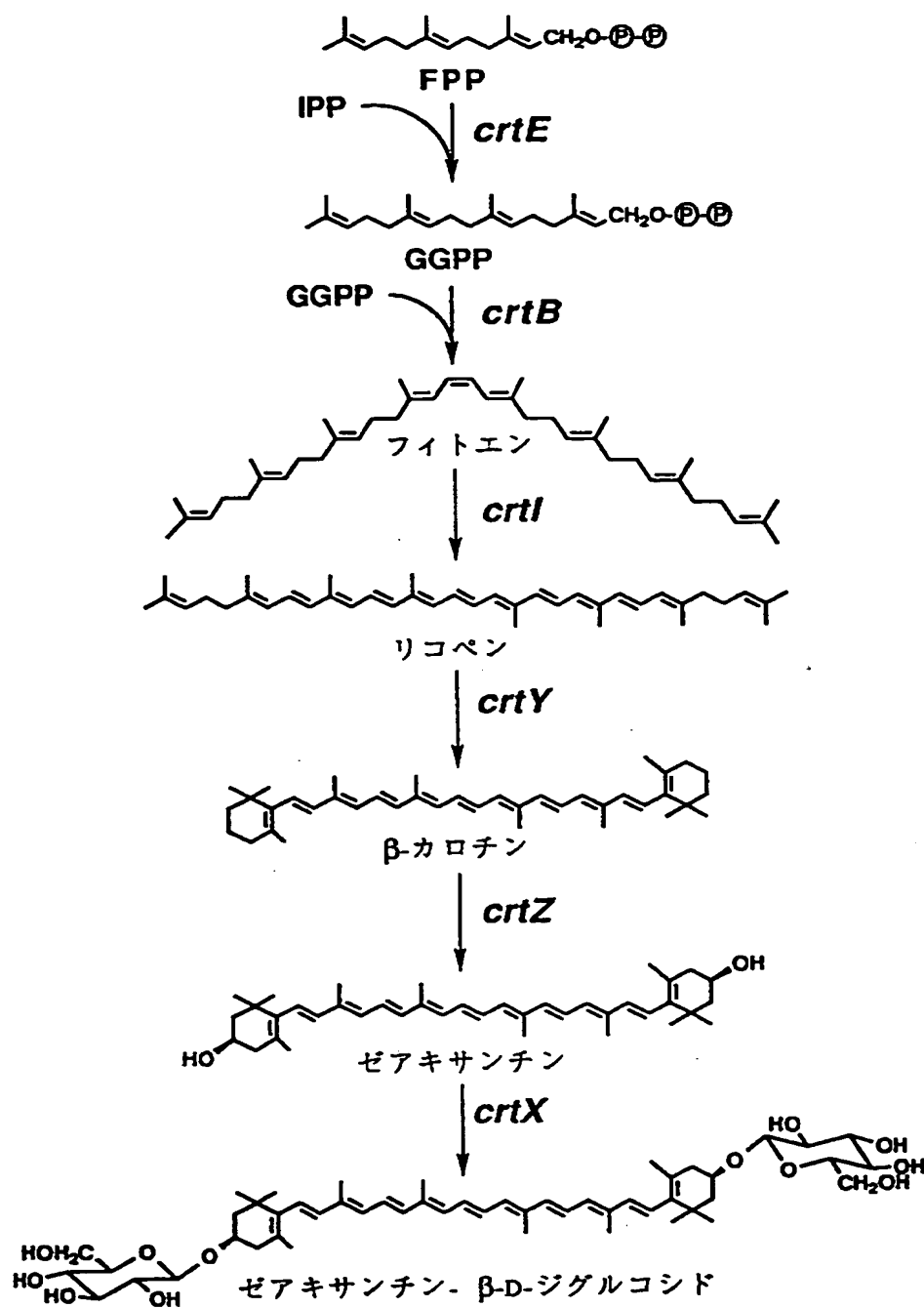
【図14】 各種大腸菌におけるリコペン (L:)、 β -カロチン (β :)、フィトエン (P:) の生産量を示す。controlは、IPPイソメラーゼ遺伝子を含まないコントロールを示す。

【書類名】 図面

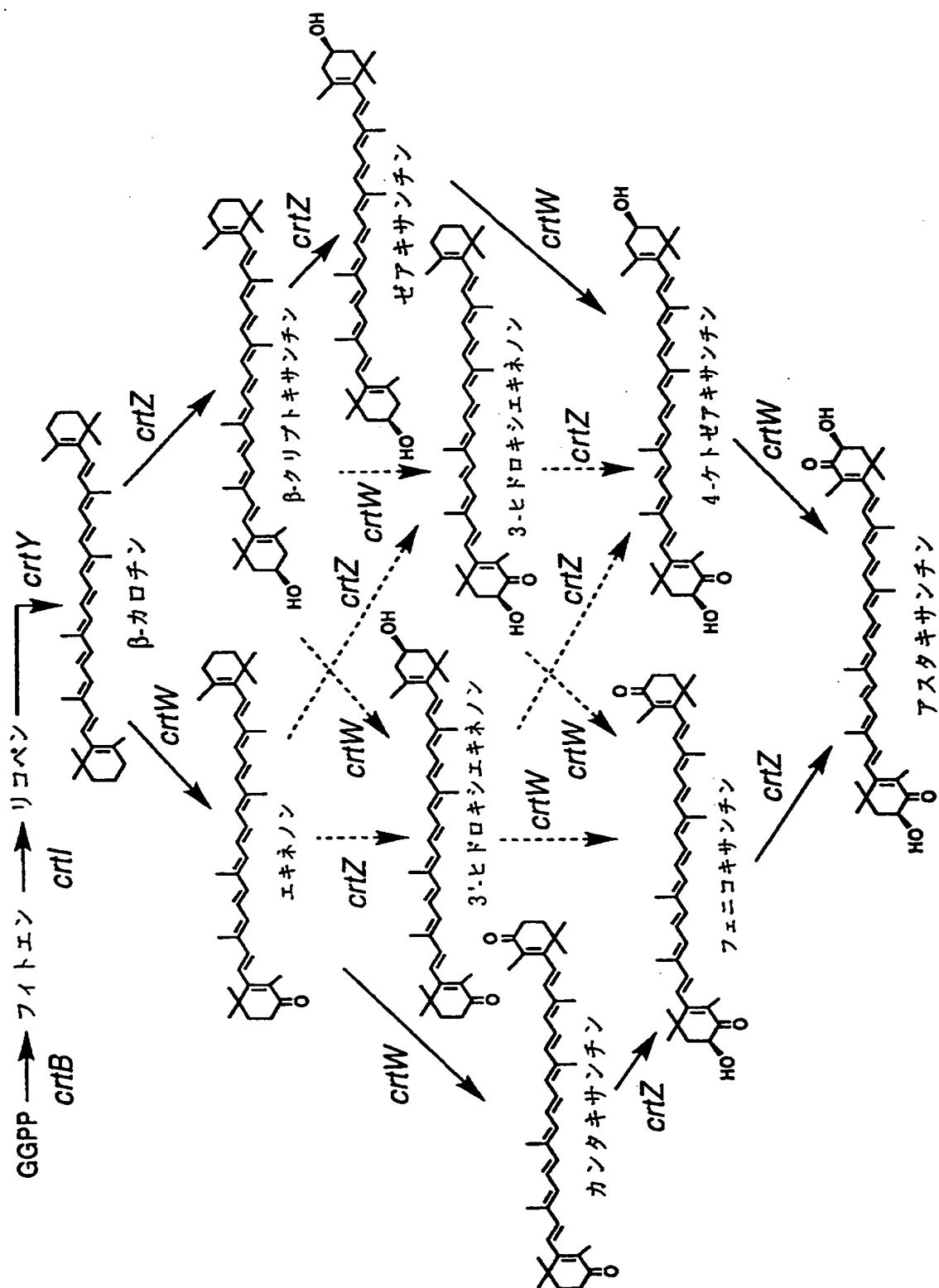
【図1】



【図2】



【図 3】



【图4】

A
↓

ATG	TCC	ATG	CCC	AAC	ATT	GTT	CCC	CCC	GCC	GAG	GTC	CGA	ACC	GAA	GGA	CTC	AGT	9	18	27	36	45	54
Met	Ser	Met	Pro	Asn	Ile	Val	Pro	Pro	Ala	Glu	Val	Arg	Thr	Glu	Gly	Leu	Ser						
TTA	GAA	GAG	TAC	GAT	GAG	GAG	CAG	GTC	AGG	CTG	ATG	GAG	GAG	CGA	TGT	ATT	CTT	63	72	81	90	99	108
Leu	Glu	Glu	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gln	Val	Arg	Leu	Met	Glu	Glu	Arg	Cys	Ile	Leu						
GTT	AAC	COG	GAC	GAT	GTG	GCC	TAT	GGA	GAG	GCT	TCG	AAA	AAG	ACC	TGC	CAC	TTG	117	126	135	144	153	162
Val	Asn	Pro	Asp	Asp	Val	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Thr	Cys	His	Leu						
ATG	TCC	AAC	ATC	AAC	GCG	CCC	AAG	GAC	CTC	CTC	CAC	CGA	GCA	TTC	TCC	GTG	TTT	171	180	189	198	207	216
Met	Ser	Asn	Ile	Asn	Ala	Pro	Lys	Asp	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Phe	Ser	Val	Phe						
CTC	TTC	CGC	CCA	TCG	GAC	GGA	GCA	CTC	CTG	CTT	CAG	CGA	AGA	GCG	GAC	GAG	AAG	225	234	243	252	261	270
Leu	Phe	Arg	Pro	Ser	Asp	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Arg	Ala	Asp	Glu	Lys						
ATT	ACG	TTC	CCT	GGA	ATG	TGG	ACC	AAC	ACG	TGT	TGC	AGT	CAT	CCT	TTG	AGC	ATC	279	288	297	306	315	324
Ile	Thr	Phe	Pro	Gly	Met	Trp	Thr	Asn	Thr	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Ile						
AAG	GGC	GAG	GTT	GAA	GAG	GAG	AAC	CAG	ATC	GGT	GTT	CGA	CGA	GCT	GCG	TCC	CGA	333	342	351	360	369	378
Lys	Gly	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Gln	Ile	Gly	Val	Arg	Arg	Ala	Ala	Ser	Arg						
AAG	TTG	GAG	CAC	GAG	CTT	GGC	GTG	CCT	ACA	TCG	TCG	ACT	CCG	CCC	GAC	TCG	TTC	387	396	405	414	423	432
Lys	Leu	Glu	His	Glu	Leu	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Asp	Ser	Phe						
ACC	TAC	CTC	ACT	AGG	ATA	CAT	TAC	CTC	GCT	CCG	AGT	GAC	GGA	CTC	TGG	GGA	GAA	441	450	459	468	477	486
Thr	Tyr	Leu	Thr	Arg	Ile	His	Tyr	Leu	Ala	Pro	Ser	Asp	Gly	Leu	Trp	Gly	Glu						
CAC	GAG	ATC	GAC	TAC	ATT	CTC	TTC	TCA	ACC	ACA	CCT	ACA	GAA	CAC	ACT	GGA	AAC	495	504	513	522	531	540
His	Glu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Leu	Phe	Ser	Thr	Thr	Pro	Thr	Glu	His	Thr	Gly	Asn						
CCT	AAC	GAA	GTC	TCT	GAC	ACT	CGA	TAT	GTC	ACC	AAG	CCC	GAG	CTC	CAG	GCG	ATG	549	558	567	576	585	594
Pro	Asn	Glu	Val	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Val	Thr	Lys	Pro	Glu	Leu	Gln	Ala	Met						

198

【図5】

603	612	621	630	639	648
TTT GAG GAC GAG TCT AAC TCA TTT ACC OCT TGG TTC AAG TTG ATT GCC CGA GAC					
Phe Glu Asp Glu Ser Asn Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Ala Arg Asp					
					216
657	666	675	684	693	702
TTC CTG TTT GGC TGG TGG GAT CAA CTT CTC GCC AGA CGA AAT GAA AAG GGT GAG					
Phe Leu Phe Gly Trp Trp Asp Gln Leu Leu Ala Arg Arg Asn Glu Lys Gly Glu					
					234
711	720	729	738	747	756
GTC GAT GCC AAA TCG TTG GAG GAT CTC TCG GAC AAC AAA GTC TGG AAG ATG TAG					
Val Asp Ala Lys Ser Leu Glu Asp Leu Ser Asp Asn Lys Val Trp Lys Met ***					
					251
					B

【図6】

C
 9 18 27 36 45 54
 ATG CAG CTG CTT GCC GAG GAC CGC ACA GAC CAT ATG AGG GGT GCA AGT ACC TGG
 Met Gln Leu Leu Ala Glu Asp Arg Thr Asp His Met Arg Gly Ala Ser Thr Trp
 63 72 81 90 99 108
 GCA GGC GGG CAG TCG CAG GAT GAG CTG ATG CTG AAG GAC GAG TGC ATC TTG GTG
 Ala Gly Gly Gln Ser Gln Asp Glu Leu Met Leu Lys Asp Glu Cys Ile Leu Val
 117 126 135 144 153 162
 GAT GCT GAC GAC AAC ATT ACA GGC CAT GTC AGC AAG CTG GAG TGC CAC AAG TTC
 Asp Ala Asp Asp Asn Ile Thr Gly His Val Ser Lys Leu Glu Cys His Lys Phe
 171 180 189 198 207 216
 CTA CCA CAT CAG CCT GCA GGC CTG CTG CAC CGG GCC TTC TCT GTA TTC CTG TTT
 Leu Pro His Gln Pro Ala Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe
 225 234 243 252 261 270
 GAC GAC CAG GGG CGA CTG CTG CTG CAA CAG CGT GCA CGA TCA AAA ATC ACA TTC
 Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Leu Gln Gln Arg Ala Arg Ser Lys Ile Thr Phe
 279 288 297 306 315 324
 CCC AGT GTG TGG ACC AAC ACC TGC TGC AGC CAC CCT CTA CAT GGG CAG ACC CCA
 Pro Ser Val Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu His Gly Gln Thr Pro
 333 342 351 360 369 378
 GAT GAG GTG GAC CAA CTA AGC CAG GTG GCC GAC GGC ACA GTA CCT GGC GCA AAG
 Asp Glu Val Asp Gln Leu Ser Gln Val Ala Asp Gly Thr Val Pro Gly Ala Lys
 387 396 405 414 423 432
 GCT GCT GCC ATC CGC AAG TTG GAG CAC GAG CTG GGG ATA CCA GCG CAC CAG CTG
 Ala Ala Ala Ile Arg Lys Leu Glu His Glu Leu Gly Ile Pro Ala His Gln Leu
 441 450 459 468 477 486
 CCG GCC AGC GCG TTT CGC TTC CTC ACG CGT TTG CAC TAC TGC GCC GCG GAC GTG
 Pro Ala Ser Ala Phe Arg Phe Leu Thr Arg Leu His Tyr Cys Ala Ala Asp Val
 495 504 513 522 531 540
 CAG CCG GCT GCG ACA CAA TCA GCA CTC TGG GGC GAG CAC GAA ATG GAC TAC ATC
 Gln Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ala Leu Trp Gly Glu His Glu Met Asp Tyr Ile
 549 558 567 576 585 594
 TTA TTC ATC CGG GCC AAC GTC ACC CTT GCG CCC AAC CCT GAC GAG GTG GAC GAA
 Leu Phe Ile Arg Ala Asn Val Thr Leu Ala Pro Asn Pro Asp Glu Val Asp Glu
 198

【図7】

603	612	621	630	639	648
GTC AGG TAC GTG ACG CAG GAG GAG CTG CGG CAG ATG ATG CAG CCG GAC AAT GGG					
Val Arg Tyr Val Thr Gln Glu Glu Leu Arg Gln Met Met Gln Pro Asp Asn Gly					
					216
657	666	675	684	693	702
TTG CAA TGG TCG CCG TGG TTT CGC ATC ATC GCC GCG CGC TTC CTT GAG CGC TGG					
Leu Gln Trp Ser Pro Trp Phe Arg Ile Ile Ala Ala Arg Phe Leu Glu Arg Trp					
					234
711	720	729	738	747	756
TGG GCT GAC CTA GAC GCG GCC CTG AAC ACT GAC AAA CAC GAG GAT TGG GGA ACG					
Trp Ala Asp Leu Asp Ala Ala Leu Asn Thr Asp Lys His Glu Asp Trp Gly Thr					
					252
765	774	780			
GTG CAT CAC ATC AAC GAA GCG TGA					
Val His His Ile Asn Glu Ala***					
		259↑			
		D			

【図8】

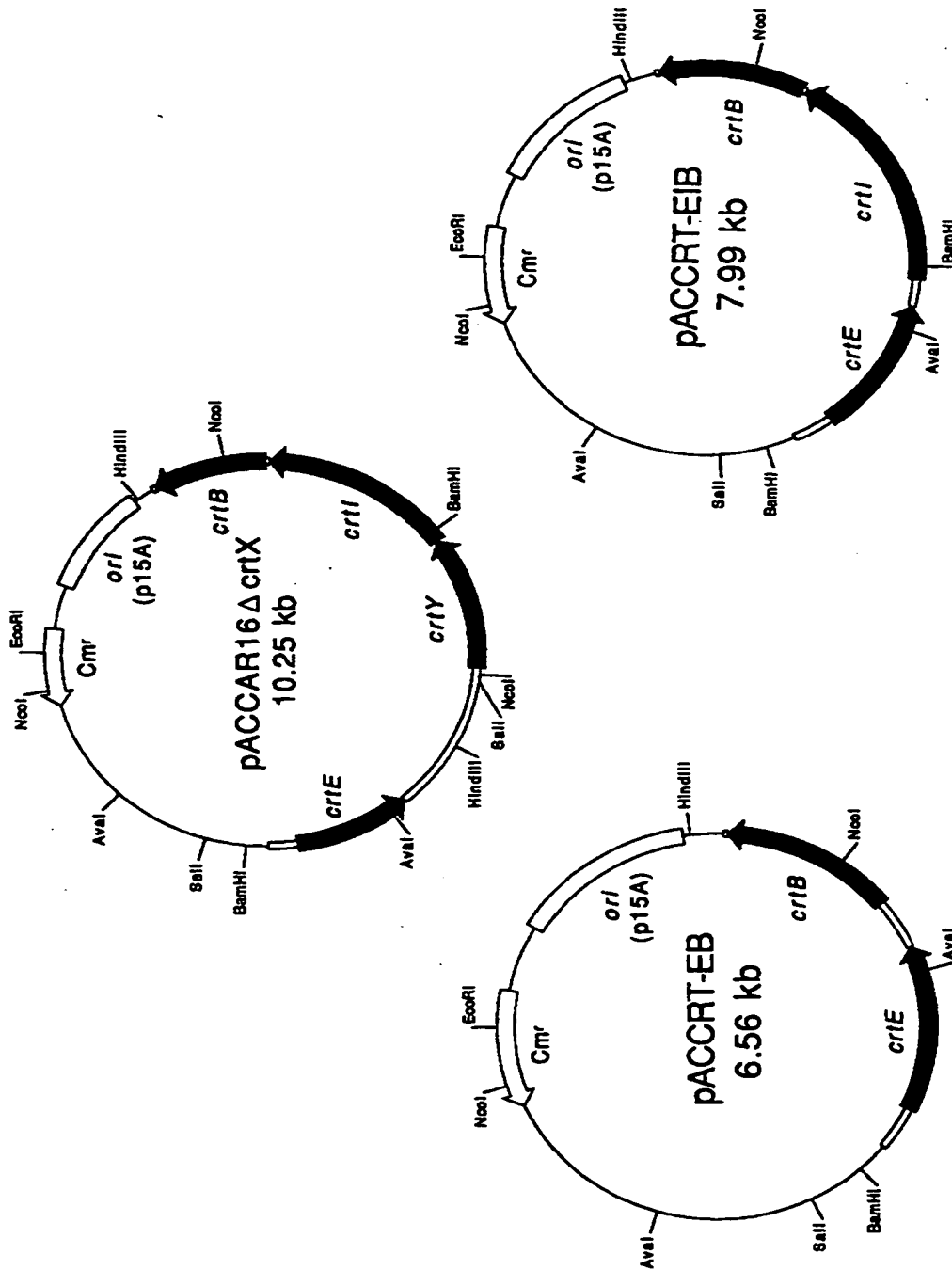
E
↓

ATG	ACT	GCC	GAC	AAC	AAT	AGT	ATG	CCC	CAT	GGT	GCA	GTA	TCT	AGT	TAC	GCC	AAA
Met	Thr	Ala	Asp	Asn	Asn	Ser	Met	Pro	His	Gly	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr	Ala	Lys
																	18
TTA	GTG	CAA	AAC	CAA	ACA	CCT	GAA	GAC	ATT	TTG	GAA	GAG	TTT	CCT	GAA	ATT	ATT
Leu	Val	Gln	Asn	Gln	Thr	Pro	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Glu	Phe	Pro	Glu	Ile	Ile
																	36
CCA	TTA	CAA	CAA	AGA	CCT	AAT	ACC	CGA	TCT	AGT	GAG	ACG	TCA	AAT	GAC	GAA	AGC
Pro	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Asn	Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Asn	Asp	Glu	Ser
																	54
GGA	GAA	ACA	TGT	TTT	TCT	GGT	CAT	GAT	GAG	GAG	CAA	ATT	AAG	TTA	ATG	AAT	GAA
Gly	Glu	Thr	Cys	Phe	Ser	Gly	His	Asp	Glu	Glu	Gln	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Glu
																	72
AAT	TGT	ATT	GTT	TTG	TGG	GAC	GAT	AAT	GCT	ATT	GGT	GCC	GGT	ACC	AAG	AAA	
Asn	Cys	Ile	Val	Leu	Asp	Trp	Asp	Asp	Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Lys
																	90
GTT	TGT	CAT	TTA	ATG	GAA	AAT	ATT	GAA	AAG	GGT	TTA	CTA	CAT	CGT	GCA	TTC	TCC
Val	Cys	His	Leu	Met	Glu	Asn	Ile	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu	His	Arg	Ala	Phe	Ser
																	108
GTC	TTT	ATT	TTC	AAT	GAA	CAA	GGT	GAA	TTA	CTT	TTA	CAA	CAA	AGA	GCC	ACT	GAA
Val	Phe	Ile	Phe	Asn	Glu	Gln	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Gln	Arg	Ala	Thr	Glu
																	126
AAA	ATA	ACT	TTC	CCT	GAT	CTT	TGG	ACT	AAC	ACA	TGC	TGC	TCT	CAT	CCA	CTA	TGT
Lys	Ile	Thr	Phe	Pro	Asp	Leu	Trp	Thr	Asn	Thr	Cys	Cys	Ser	His	Pro	Leu	Cys
																	144
ATT	GAT	GAC	GAA	TTA	GGT	TTG	AAG	GGT	AAG	CTA	GAC	GAT	AAG	ATT	AAG	GGC	GCT
Ile	Asp	Asp	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Asp	Lys	Ile	Lys	Gly	Ala
																	162
ATT	ACT	GCG	GCG	GTG	AGA	AAA	CTA	GAT	CAT	GAA	TTA	GGT	ATT	CCA	GAA	GAT	GAA
Ile	Thr	Ala	Ala	Val	Arg	Lys	Leu	Asp	His	Glu	Leu	Gly	Ile	Pro	Glu	Asp	Glu
																	180

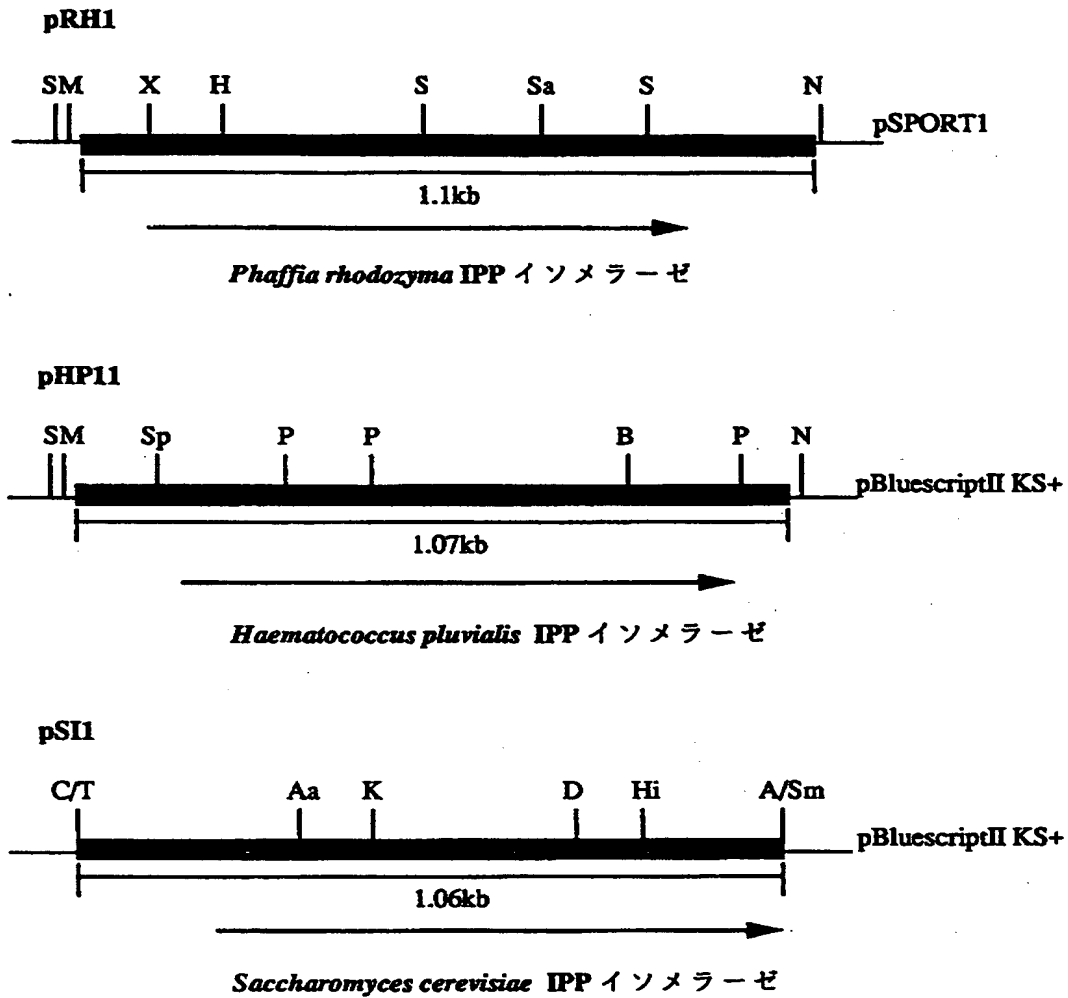
【図9】

549	558	567	576	585	594
ACT AAG ACA AGG GGT AAG TTT CAC TTT TTA AAC AGA ATC CAT TAC ATG GCA CCA					
Thr Lys Thr Arg Gly Lys Phe His Phe Leu Asn Arg Ile His Tyr Met Ala Pro					
					198
603	612	621	630	639	648
AGC AAT GAA CCA TGG GGT GAA CAT GAA ATT GAT TAC ATC CTA TTT TAT AAG ATC					
Ser Asn Glu Pro Trp Gly Glu His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu Phe Tyr Lys Ile					
					216
657	666	675	684	693	702
AAC GCT AAA GAA AAC TTG ACT GTC AAC CCA AAC GTC AAT GAA GTT AGA GAC TTC					
Asn Ala Lys Glu Asn Leu Thr Val Asn Pro Asn Val Asn Glu Val Arg Asp Phe					
					234
711	720	729	738	747	756
AAA TGG GTT TCA CCA AAT GAT TTG AAA ACT ATG TTT GCT GAC CCA AGT TAC AAG					
Lys Trp Val Ser Pro Asn Asp Leu Lys Thr Met Phe Ala Asp Pro Ser Tyr Lys					
					252
765	774	783	792	801	810
TTT ACG CCT TGG TTT AAG ATT ATT TGC GAG AAT TAC TTA TTC AAC TGG TGG GAG					
Phe Thr Pro Trp Phe Lys Ile Ile Cys Glu Asn Tyr Leu Phe Asn Trp Trp Glu					
					270
819	828	837	846	855	864
CAA TTA GAT GAC CTT TCT GAA GTG GAA AAT GAC AGG CAA ATT CAT AGA ATG CTA					
Gln Leu Asp Asp Leu Ser Glu Val Glu Asn Asp Arg Gln Ile His Arg Met Leu					
					288
867					
TAA					F

【図10】

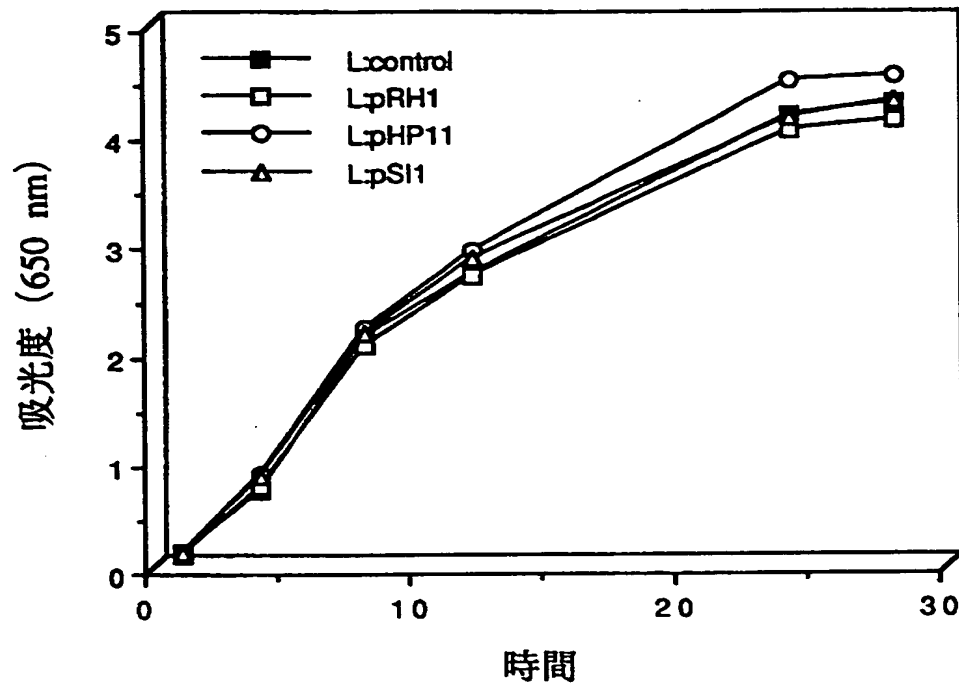


【図11】

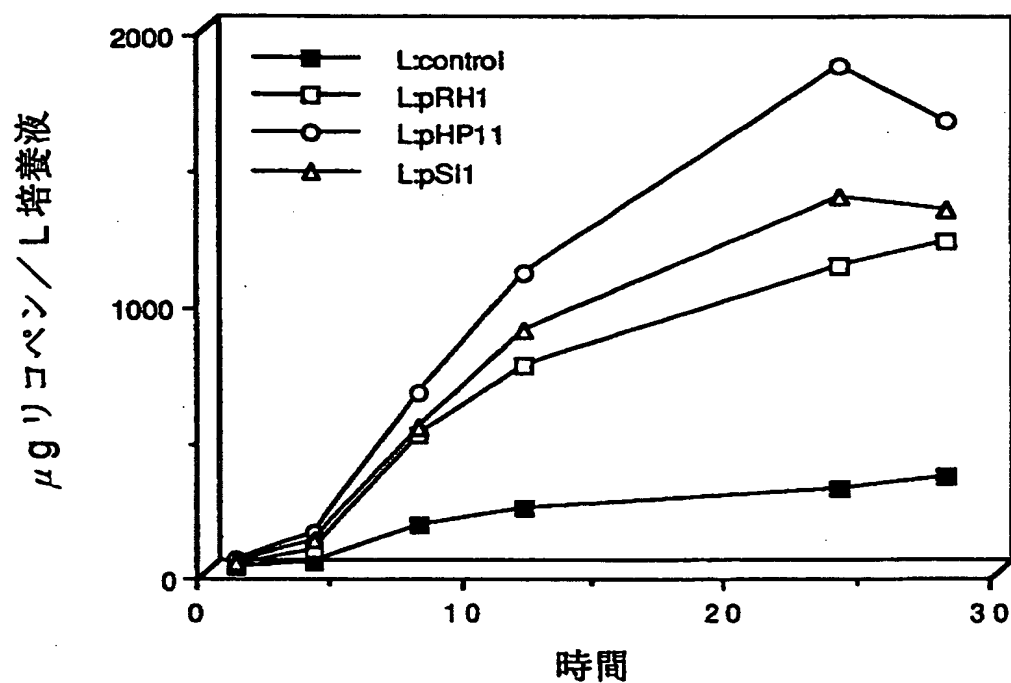


Aa: AatII, A: AccII, B: BssHII, D: DraI, Hi: HincII,
H: HpaI, K: KpnI, M: MluI, N: NotI, P: PstI, Sa: SacI,
S: SalI, Sp: SphI, X: XbaI

【図12】



【図13】



【図14】

大腸菌	μg カロチン / g 乾重量	生産比
L: control	228	1
L: pRH1	825	3.6
L: pHP11	1029	4.5
L: pSI1	859	3.8
β: control	488	1
β: pRH1	709	1.5
P: control	246	1
P: pRH1	413	1.7
P: pHP11	504	2.1

【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 カロチノイドの生産量を増量させる特性を有し、実質的に配列番号1または配列番号2に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA鎖、またはそれとハイブリダイズするDNA鎖、ならびに該DNA鎖をカロチノイド産生微生物に導入して該形質転換微生物を培地で培養し、培養物のカロチノイド含量を増量させることを特徴とする、カロチノイドの製造法。

【効果】 本発明によれば、微生物によるカロチノイドの生合成において、その生産量を有意に増量させることができる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000253503
【住所又は居所】 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号
【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100091096
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門2丁目7番7号 虎ノ門中田ビル
2F 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門2丁目7番7号 虎ノ門中田ビル
2F 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】 石井 貞次

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号
氏 名 麒麟麦酒株式会社
2. 変更年月日 1995年 6月14日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区新川二丁目10番1号
氏 名 麒麟麦酒株式会社